



蝦血培養基之研發與應用

張錦宜、吳嘉哲、陳力豪

水產試驗所水產養殖組

前言

細菌性病原是蝦類養殖的重要潛在威脅之一，但因大部分的水產病原菌都是水域環境中的常在菌，現場監測時，很難單從水體檢出某些特定種類的細菌，就據以判定該養殖池爆發疾病的風險指數；因此，病原性指標的檢測，成為魚池健康管理中不可忽略的一環。

細菌的溶血性與其致病能力密切相關，臨床醫學上常以溶血活性作為病原菌的重要指標，其檢測方法亦極為簡單，只要將細菌接種於商品化或自行製備的羊血培養基上，適當培養之後，即可依菌落周邊出現的透明溶血區，用肉眼判定細菌的溶血活性（圖1a）。羊血培養基的判讀結果適用於同樣以螯合鐵為血紅素中心的哺乳類其他物種，甚至應用到魚類、鳥類等非哺乳類的脊椎動物也少有爭議；但是蝦類與哺乳類在演化上相去太遠，其血球有核，而且主要氣體交換分子是以螯合銅為中心的血藍素，因此，要將羊血培養基上判讀到的溶血能力與細菌對蝦類是否具病原性畫上等號，實不無可議之處。此外，因為蝦血近乎無色，若以蝦血取代羊血製成平板培養基，則無法像紅色的羊血培養基一樣，在具溶血性的細菌菌落周邊呈現

肉眼清晰可見的透明溶血區塊，如果還需藉由顯微鏡判讀溶血結果，就喪失了使用培養基快速篩選、監控病原菌的優點。

本研究的目的，即在開發出一種以蝦血為基質的血液培養基，藉由特殊的染色設計，使細菌對蝦類血球的溶血結果清晰呈現，可直接用肉眼判別，並做為病原性指標，供第一線防疫人員、水產獸醫師或魚病研究者快速研判警訊、擬定防治對策。

蝦血球細胞染劑之篩選

本研究採用 23 種細胞染劑，包括苯胺藍 (aniline blue)、天青 B (azure B)、亮藍 R (brilliant blue R)、溴甲酚綠 (bromocresol green)、溴甲酚紫 (bromocresol purple)、溴百里酚藍 (bromothymol blue)、溴酚藍 (bromphenol blue)、結晶紫 (crystal violet)、甲基黃 (dimethyl yellow)、伊紅 (eosin-Y)、姬姆薩染色液 (Giemsa stain solution)、蘇木紫 (Gill's hematoxylin)、孔雀石綠 (malachite green)、甲烯藍 (methylene blue)、中性紅 (neutral red)、尼羅藍 (Nile blue)、酚紅 (phenol red)、孟加拉玫瑰紅 (rose Bengal)、蘇丹紅四號 (Sudan IV)、百里酚藍 (thymol blue)、甲苯胺藍 (toluidine blue)、台盼藍

(trypan blue) 及瑞氏染色液 (Wright stain solution)，結果發現孟加拉玫瑰紅對草蝦的血球細胞親和力最佳，染色效果最好，而且與背景基質有明顯對比色差 (圖 2)，適合做為後續蝦血培養基開發之用。

蝦血培養基之製備

抽血之針頭與針筒內壁先以 citrate-EDTA buffer (glucose 0.1 M, trisodium citrate 30 mM, citric acid 26 mM, EDTA 10 mM, pH 4.6, 溶於鹽度 20 psu 的海水，以 121°C，15 min 滅菌) 進行抗凝集處理，再自蝦之第一及第二泳足間的腹腔抽取血淋巴液 1 ml，注入預置 0.2 ml citrate-EDTA buffer 的試管，輕輕轉動使之均勻混合。

蝦血培養基之製備則是取 15 ml 蝦血培養基基質 (prawn blood agar base: Bacto peptone 10 g, sodium chloride 5 g, rose Bengal 0.2 g, Bacto agar 15 g，溶於 1,000 ml 蒸餾水中，pH 6.8)，先以 121°C，15 min 滅菌並冷卻至 55°C 後，再加入經上述抗凝處理過的蝦血 1 ml，均勻混合後倒入平板培養皿中，冷卻後使用。

製備完成的蝦血培養基呈現玫瑰紅色，因為蝦血球細胞與孟加拉玫瑰紅的親和力遠高於培養基基質中其他的組成分子，因此本培養基的呈色，完全係由被染過色的蝦血球細胞均勻分布在培養皿中所產生的巨視效果，具溶血活性的細菌將蝦血培養基中的血球破壞、分解之後，因為愈小的色素顆粒呈色愈不明顯，就會在菌落周邊出現肉眼明顯可見的透明溶血區域 (圖 1b)。

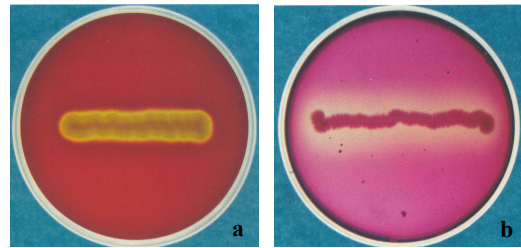


圖 1 細菌在羊血培養基(a)及蝦血培養基(b)上的溶血表現，菌落周邊呈現清晰之透明溶血區域

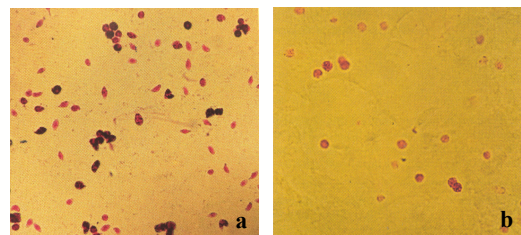


圖 2 草蝦血球細胞以不同細胞染劑染色結果：(a) 孟加拉玫瑰紅；(b)伊紅

蝦血培養基開發之供試菌株

本研究採用 11 株標準菌株及 34 株自蝦肝胰臟及養殖環境中分離的細菌做為供試菌株 (表 1)，同時比較各菌株接種於蝦血培養基與羊血培養基上的溶血反應。

蝦血培養基與羊血培養基的比較

將上述 45 株供試菌株分別接種於蝦血培養基與羊血培養基上，於 23°C 培養 3 天及 7 天後記錄其溶血情形。結果如表 1 所示，供試菌株在蝦血培養基與羊血培養基上的溶血反應有約 42% 的差異 (即 45 株菌株中有 19 株結果不同)。此外，水產細菌的溶血性狀在蝦血培養基上表現迅速且穩定，45 株中僅有 1 株於培養 7 天後溶血結果與培養 3 天時

不符；相較於此，部分水產細菌在傳統羊血培養基上的溶血透明環呈現的時間較晚且不

穩定，45 株供試菌株中有 16 株培養 3 天與 7 天呈現的溶血結果並不一致。

表 1 45 株水產細菌在不同血液培養基上的溶血性判讀結果

菌種	菌株來源	溶血性判讀結果(3 天/7 天)	
		蝦血培養基	羊血培養基
<i>Acinetobacter genospecies</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BCRC11032	+/+	+/+
<i>A. hydrophila</i>	蝦肝胰臟	+/+	+/+
<i>A. hydrophila</i>	蝦肝胰臟	-/-	+/+
<i>A. hydrophila</i>	蝦池	-/-	+/+
<i>A. hydrophila</i>	蝦肝胰臟	-/-	+/+
<i>A. latius</i>	蝦池	+/+	+/+
<i>A. latius</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>A. sobria</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>A. radioresistens</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>A. radioresistens</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>Alcaligenes latius</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>Burkholderia cepacia</i>	蝦池	-/+	-/+
<i>B. cepacia</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>Flavobacterium gleum</i>	蝦池	+/+	-/+
<i>Lampropedia hyalina</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>Moraxella bovis</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>Moraxella sp.</i>	蝦池	-/-	+/+
<i>Moraxella sp.</i>	蝦池	-/-	-/+
<i>Moraxella sp.</i>	蝦肝胰臟	-/-	-/+
<i>Psychrobacter immobilis</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>P. immobilis</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>Serratia liquefaciens</i>	蝦池	-/-	-/-
<i>Shewanella putrefaciens B</i>	蝦池	+/+	+/+
<i>S. putrefaciens B</i>	蝦池	+/+	+/+
<i>S. putrefaciens C</i>	蝦肝胰臟	+/+	+/+
<i>S. putrefaciens C</i>	蝦池	+/+	+/+
<i>S. putrefaciens C</i>	蝦肝胰臟	-/-	+/+
<i>S. putrefaciens D</i>	蝦肝胰臟	+/+	+/+
<i>V. alginolyticus</i>	BCRC12829	+/+	-/-
<i>V. alginolyticus</i>	蝦池	+/+	-/-
<i>V. anguillarum</i>	BCRC12908	+/+	+/+
<i>V. anguillarum</i>	蝦肝胰臟	+/+	+/+
<i>V. carchariae</i>	BCRC14141	+/+	-/+
<i>V. carchariae</i>	蝦池	+/+	+/+
<i>V. damsela</i>	BCRC12906	-/-	+/+
<i>V. harveyi</i>	BCRC12907	+/+	+/+
<i>V. mimicus</i>	BCRC14161	+/+	+/+
<i>V. mimicus</i>	蝦肝胰臟	+/+	+/+
<i>V. ordalii</i>	BCRC13866	-/-	-/+
<i>V. parahaemolyticus</i>	BCRC12865	+/+	-/+
<i>V. parahaemolyticus</i>	蝦肝胰臟	+/+	-/+
<i>V. salmonicida</i>	BCRC12844	-/-	-/+
<i>V. vulnificus</i>	BCRC12905	-/-	-/+
<i>Xanthomonas oryzae</i>	蝦池	-/-	-/+

以蝦血培養基篩選蝦類病原菌

選取 8 株在蝦血培養基與羊血培養基上溶血表現各異的菌株 (2 株在 2 種培養基上皆有溶血活性、2 株僅在蝦血培養基上有溶血活性、2 株僅在羊血培養基上有溶血活性、2 株在 2 種培養基上皆無溶血活性)，做為人工感染之攻毒菌株。將攻毒菌株濃度調整為 10^7 CFU/ml，以 1 % v/wt 的劑量進行實驗用蝦 (約 10 g 大小) 之肌肉注射，每組 12 尾，二重覆試驗，感染後持續觀察 14 天，計錄其活存率。此外，為確認人工感染試驗中死亡的蝦與攻毒菌株的關係，另自試驗期間死亡的蝦肝胰腺隨機挑選 10 個菌落，經 16S rDNA 序列比對後，若有超過 5 個菌落與原攻毒菌株相符，則代表此一獨立樣本可再分離到原攻毒菌株，符合病原菌準則。

實驗結束後，全數尚存活的試驗蝦亦自肝胰腺以同樣的方式分析菌株之再分離率，以比較不同菌株入侵及常駐寄主體內之能力。結果如表 2 所示，以蝦血培養基上有溶血反應的菌株進行人工感染後，實驗蝦的活存率顯著偏低 (分別為 0%、17%、17% 及 25%)，其攻毒菌株的再分離率也相對較高

(分別為 100%、91%、87% 及 79%)；而以蝦血培養基上未有溶血反應的菌株進行人工感染後，實驗蝦的活存率則明顯較高 (分別為 54%、83%、92% 及 100%)。另一方面，攻毒菌株在羊血培養基上的溶血反應則無法與實驗蝦的活存率有顯著的關連，可見傳統以羊血培養基篩選蝦類病原菌的習用方法，並不正確。

結語

本研究開發出的蝦血培養基，可以藉由經特殊染色的蝦血球遭細菌破壞後，巨觀上所呈現出的透明區塊視覺效果，輕易以肉眼判別試驗菌株對蝦類的溶血活性；而且此溶血活性經人工感染試驗，進一步證實與菌株的病原性有極高的相關性。因此，本培養基比傳統市售羊血培養基更適合檢測蝦類病原菌，可大量且快速地自檢體或養殖環境中篩選與分離菌株，計算潛在病原菌的數量，以評估爆發細菌性疾病的風險。若能善用此一工具，定可大幅減少病原檢測所需之時間與研究人力，卒能有效提升防疫效率，完善養殖現場之健康管理。

表 2 不同溶血活性之水產細菌對白蝦之病原性試驗結果

菌種	菌株來源	溶血性判讀結果(3 天/7 天)		蝦活存率 (%)	攻毒菌株再分離率(%)
		蝦血培養基	羊血培養基		
<i>Aeromonas sobria</i>	蝦池	—	—	83 ^c	8
<i>Moraxella</i> sp.	蝦池	—	+	100 ^c	4
<i>V. alginolyticus</i>	BCRC12829	+	—	17 ^a	91
<i>V. anguillarum</i>	BCRC12908	+	+	17 ^a	87
<i>V. carchariae</i>	BCRC14141	+	—	25 ^a	79
<i>V. damsela</i>	BCRC12906	—	+	54 ^b	58
<i>V. parahaemolyticus</i>	BCRC12865	+	+	0 ^a	100
<i>V. salmonicida</i>	BCRC12844	—	—	92 ^c	17

* 同一欄位中英文上標字不同表示有顯著差異 ($p < 0.05$)